

⑤ Int. Cl.⁴G 01 N 33/50
C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

P-8305-2G

8412-4B

A-8412-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月21日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全8頁)

⑭ 発明の名称 核酸を結合してなる担体並びに核酸の検出法および分離法

⑮ 特 願 昭61-261503

⑯ 出 願 昭61(1986)10月31日

⑰ 発 明 者 古 市 泰 宏 神奈川県鎌倉市寺分3丁目24-9
⑱ 発 明 者 栗 林 恵 子 神奈川県横浜市磯子区洋光台6丁目8番5号
⑲ 出 願 人 エフ・ホフマン・ラ・ スイス国バーゼル グレンツァーヘルストラッセ124-184
ロシュ・ウント・コン
パニー・アクチエンゲ
ゼルシャフト
⑳ 出 願 人 日本合成ゴム株式会社 東京都中央区築地2丁目11番24号
㉑ 代 理 人 弁理士 岩見谷 周志

明 細 書

1. 発明の名称

核酸を結合してなる担体並びに
核酸の検出法および分離法

2. 特許請求の範囲

1. 有機高分子物質からなり表面が非多孔質の
粒径0.01~50 μ mの粒子の表面に、少なくとも部
分的に一本鎖である核酸を結合してなるハイブリ
ッド形成用水不溶性担体。

2. 検体試料中の特定の塩基配列を含む核酸の
検出方法であって、

前記核酸を、少なくとも前記の特定の塩基配列
の部分が一本鎖である状態で、有機高分子物質か
らなり表面が非多孔質の粒径0.01~50 μ mの粒子
の表面に結合してハイブリッド形成用水不溶性担
体を形成し、

次に、該担体と、前記の特定の塩基配列の少な
くとも一部に対して相補的な塩基配列を含む標識
核酸プローブとをハイブリッド形成せしめ、

次に、前記担体とハイブリッド形成した標識核

酸プローブを検出することからなる核酸の検出方
法。

3. 核酸試料中から特定の塩基配列を含む核酸
を分離する方法であって、

前記特定の塩基配列の少なくとも一部に対して
相補的な塩基配列を含む核酸を、少なくとも該相
補的な塩基配列の部分が一本鎖である状態で、有
機高分子物質からなり表面が非多孔質の粒径0.01
~50 μ mの粒子の表面に結合してハイブリッド形
成用水不溶性担体を形成し、

次に、該担体と、前記の核酸試料中の特定の塩
基配列を含む核酸とをハイブリッド形成せしめ、

次に、前記担体とハイブリッド形成した核酸を
分離することからなる核酸の分離方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、核酸を結合してなる水不溶性担体
に関し、特に、相補的な塩基配列を含む核酸間のハ
イブリッド形成を利用する核酸の検出および分離、
精製に有用である、少なくとも部分的に一本鎖で

ある核酸を結合してなる水不溶性担体並びにそれを利用する核酸の検出方法および分離方法に関する。

従来の技術

検体試料中の目的とする特定塩基配列を有する核酸を検出する方法として、核酸のハイブリッド形成分析が利用されている。

この分析は、組み換えDNA技術の分野の研究者等によって開発された方法で、一本鎖に変性されたDNAまたはRNAの核酸が適当な条件下で相補的な塩基配列を含む別の一本鎖核酸と塩基間の水素結合を介してハイブリッドを形成することを利用するものである。

従来の核酸のハイブリッド形成分析は通常、以下の方法で行われている。

まず、検体試料中の核酸を変性して一本鎖とした後、支持体であるニトロセルロース製やナイロン製のメンブランフィルターに80℃で3時間程度焼き付け固定化する。

次に、標識プローブの非特異的吸着を抑えるた

このように、従来のフィルターを支持体とした核酸のハイブリッド形成分析では、検体試料中の核酸の固定、プレハイブリダイゼーション、標識プローブとのハイブリッド形成、洗浄、検出という一連の操作を必要とするので時間がかかり、例えば臨床実験で日常的に用いるのには適さないという問題を有する。

特に核酸の固定化における焼き付け、プレハイブリダイゼーション、洗浄という操作は煩雑で、分析に要する時間を長くする原因となっている。

(Lin et al.: Journal of Virology, Vol.55, 509 ページ(1985))。

また、フィルター上でのハイブリッド形成は、固相の一本鎖核酸と液相の標識プローブとの反応が溶液中で不均一な状態で実施されるため、ハイブリッドの形成速度が遅いという問題を有する。しかもハイブリッド形成効率は極めて低く、通常、添加された標識プローブのうち計算上期待される値の数%がハイブリッド形成に利用されるにすぎない。

めにプレハイブリダイゼーションを行う。プレハイブリダイゼーションは通常37℃で30分以上を要する。ここで、標識プローブとは、トレーサーとして検出の目的となる、特定塩基配列を含む一本鎖核酸からなり、容易に検出できる標識を付したものである。プレハイブリダイゼーションの後、標識プローブを、試料の核酸を固定したメンブランフィルターに添加し、ハイブリッド形成に適する溶液、例えば、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、サケ精子DNAおよびホルムアミドを含むトリス塩酸緩衝液中で一晩インキュベーションを行う。次いで、標識プローブの非特異的な吸着を除去するために特定塩化合物の溶液中で2時間程度加温することによりフィルターの洗浄を実施する。

この後、フィルターに固定化された一本鎖核酸とハイブリッドを形成している標識プローブの標識をトレーサーとして検出することにより検体試料の核酸中の特定塩基配列を検出する。

発明が解決しようとする問題点

さらに、フィルターを支持体とした核酸のハイブリッド形成分析は、感度や精度が低いという問題もある。

本発明の目的は、前記の従来技術の問題点を解決し、特定の塩基配列を含む核酸の検出を短時間でかつ簡便な操作で行うことができ、ハイブリッド形成効率が高く、しかも高感度かつ高精度の測定を実現し得る新規なハイブリッド形成用担体を提供することにある。

問題を解決するための手段

本発明は、前記の問題点を解決する手段として、有機高分子物質からなり表面が非多孔質の粒径0.01~50 μ mの粒子の表面に、少なくとも部分的に一本鎖である核酸を結合してなるハイブリッド形成用水不溶性担体を提供するものである。

本発明の担体に用いられる有機高分子物質としては、例えば、スチレン、クロルスチレン、クロロメチルスチレン、 α -メチルスチレン、ジビニルベンゼン、スチレンスルホン酸ナトリウム、(メタ)アクリル酸、(メタ)アクリル酸メチル、

(メタ) アクリル酸エチル、(メタ) アクリル酸-n-ブチル、(メタ) アクリル酸-2-ヒドロキシエチル、(メタ) アクリル酸ポリオキシエチレン、(メタ) アクリル酸グリシジル、エチレングリコール-ジ- (メタ) アクリル酸エステル、(メタ) アクリル酸トリプロモフェニル、(メタ) アクリロニトリル、(メタ) アクロレイン、(メタ) アクリルアミド、メチレンビス(メタ) アクリルアミド、ブタジエン、イソブレン、酢酸ビニル、ビニルピリジン、N-ビニルピロリドン、塩化ビニル、臭化ビニル等の芳香族ビニル化合物、 α 、 β -不飽和カルボン酸のエステル類もしくはアミド類、 α 、 β -不飽和ニトリル化合物、ハロゲン化ビニル化合物、共役ジエン化合物、ならびに低級脂肪酸ビニルエステルからなるビニル系単量体の一種以上を重合して得られる水不溶性の有機高分子物質や該有機高分子物質を化学的に変性して得られる水不溶性の有機高分子物質、もしくはアガロース、デキストラン、セルロース、カルボキシメチルセルロース等の多糖類の架橋体やメ

析の感度や精度の向上が望めない。

なお、このように、粒子の表面は非多孔質であることが必要であるが、粒子の内部に独立気泡等が存在してもよい。

本発明に使用する粒子の粒径は、遠心分離等の簡便な操作で粒子を回収するために $0.01\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $0.05\mu\text{m}$ 以上である必要がある。また、粒子の単位沈降体積当りの表面積を大きくし、かつハイブリッド形成に適当な条件下で担体が均一に分散する状態を保つことによって高いハイブリッド形成効率を達成するために、 $50\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $10\mu\text{m}$ 以下である必要がある。

さらに、本発明に用いる粒子は、水性媒体中で使用するために、水不溶性でなければならない。

本発明において、核酸を粒子に結合させる方法としては、共有結合、静電的結合、物理吸着を利用することができるが、結合された核酸の安定性、および試料中の核酸や標識プローブのハイブリッド形成によらない非特異的吸着を防ぐことが必要の場合の粒子表面のブロックの簡便さを考慮する

チル化アルブミン、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン等のタンパク質の架橋体をあげることができる。

これらの有機高分子物質からなる粒子(以下、単に「粒子」と称する)は、乳化重合、懸濁重合、溶液沈殿重合等によって製造することができる。また、有機高分子物質溶液を非溶媒中に分散し架橋したり、または溶媒を揮散させること等によって該粒子を得ることができるが、粒子の製造方法はこれらに限定されるものではない。

なお、この粒子には、必要に応じて充填剤、例えば、磁性粉末を含有させてもよい。

本発明に用いられる粒子の表面は非多孔質でなければならない。ここで、粒子の表面が「非多孔質」であるとは、長径が 100\AA 以上である孔を粒子の表面に有しないことを意味する。粒子の表面が非多孔質でないと、即ち、長径で 100\AA 以上である孔が粒子の表面に存在すると、後述の核酸検出法などで用いられる標識プローブが粒子の内部に捕捉される等の原因によりハイブリッド形成分

と、共有結合が好ましい。

したがって、粒子はその表面に、カルボキシル基、アミノ基($-\text{NH}_2$)、ヒドロキシル基、ホルミル基、エポキシ基($-\text{CH}-\text{CH}_2$)、スクシンイミ



ド基等の核酸と共有結合を形成するのに利用しうる官能基を粒子表面積 1nm^2 当り1ヶ以上有することが望ましい。核酸を粒子に共有結合により結合させる方法としては、例えば、「固定化酵素」(千畑一郎編、講談社出版、1975)に記載されている、カルボジイミド活性化法、臭化シアン法、ジアゾ化法、トリアジン活性化法、イソシアナート活性化法、アルキル化法等の結合法におけるリガンドの代りに核酸を用いることで利用することができる。

また、結合法として静電的結合または物理吸着を利用する場合は、標識プローブ等の非特異的吸着を抑えるために、プレハイブリダイゼーションを実施する必要がある。

本発明における核酸としては、高等動物、高等

植物、カビ類、バクテリア、ウィルス等に由来する遺伝子、メッセンジャーRNA、クローン化DNAおよび合成ヌクレオチドを例示することができ、検出、精製等の目的または手段となる核酸が有する特定塩基配列の少なくとも一部と実質的に相補的な塩基配列の部分を、一本鎖の状態、少なくとも一部に含むDNA分子またはRNA分子である。このように、この核酸は、全体が一本鎖であるか、または少なくともハイブリッド形成に必要な部分が部分的に一本鎖化されているものであればよい。

本発明において、粒子に核酸を結合させる条件は、その方法によって異なるが、粒子1 μ mに対する核酸の使用量は、通常1 μ g以下である。

また、本発明は、特定の塩基配列を含む核酸の分析方法に関する。

すなわち、本発明は、

検体試料中の特定の塩基配列を含む核酸の検出方法であって、

前記核酸を、少なくとも前記の特定の塩基配列の部分が一本鎖である状態で、有機高分子物質か

らなり表面が非多孔質の粒径0.01~50 μ mの粒子の表面に結合してハイブリッド形成用水不溶性担体を形成し、

次に、該担体と、前記の特定の塩基配列の少なくとも一部に対して相補的な塩基配列を含む標識核酸プローブとをハイブリッド形成せしめ、

次に、前記担体とハイブリッド形成した標識核酸プローブを検出することからなる核酸の検出方法をも提供する。

上記核酸の検出方法に用いられる標識核酸プローブとは、直接の検出対象となる一本鎖核酸からなり、容易に検出できる標識を付したものである。また、用いられる標識は、酵素学的に活性な基、螢光体、発色団、発光体、特異的な結合が可能な配位子、重金属および放射性同位元素のような、トレーサーとして容易に検出することができる物質であり、このためにハイブリッド形成によって担体上にトラップされた標識プローブは容易に検出することができる。

上記の検出方法は、直接法というべき方法で、

より具体的には、例えば、次のように実施される。

まず、検体試料に含まれている核酸をアルカリ処理や熱処理により少なくとも部分的に一本鎖化した後、有機高分子物質からなる粒子に結合してハイブリッド形成用担体を得る。次に、この担体をハイブリッド形成に適した緩衝液に懸濁し、標識核酸プローブを添加して粒子に結合された核酸とハイブリッド形成させ、次いでハイブリッドした標識プローブを検出する。

ハイブリッド形成に適当な緩衝液としては、例えば、10mMのトリス-塩酸緩衝液に0.5(w/v)%となる量のドデシル硫酸ナトリウム、75mMとなる量のクエン酸ナトリウム、750mMとなる量の塩化ナトリウム、50(v/v)%となる量のホルムアミド、および10(w/v)%となる量のサケ精子DNAを混合した水溶液などが挙げられるが、この組成に限定されるものではない。

ハイブリッド形成の際の反応温度は通常0~70℃の範囲であり、反応時間は通常2時間以内で十分である。

前記本発明のハイブリッド形成用水不溶性担体は、前記の直接法のほかに、サンドイッチ法および競合法としても核酸の検出方法に利用することができる。

サンドイッチ法によると、まず、検体試料から検出すべき核酸が有する塩基配列の中から、異なりかつ重複しない2つの特定塩基配列を選択する。それぞれの特定塩基配列に相補的な塩基配列を有する2種類の核酸のうち、一方を粒子に結合してハイブリッド形成用水不溶性担体とし、他方を適当な標識でラベルして標識核酸プローブとする。これらの担体および標識核酸プローブを、検体試料中の核酸とのハイブリッド形成に供すると、検体試料中に検出すべき特定の塩基配列を含む核酸が存在すれば、担体の核酸と標識核酸プローブとが検体試料中の該核酸を挟む形でハイブリッド形成により結合する。次に、担体に対して結合した標識核酸プローブをトレーサーとして検出することにより、特定の塩基配列を含む核酸を検出することができる。

競合法によると、まず、検体試料中の検出すべき核酸の特定塩基配列に相補的な塩基配列を含む少なくとも部分的に一本鎖である核酸を粒子に結合してハイブリッド形成用水不溶性担体とする。一方、検体試料中の検出すべき核酸と実質的に同等な特定塩基配列を含む核酸に標識を付し、プローブとする。

次にハイブリッド形成用水不溶性担体と検体試料とプローブを混合してハイブリッド形成反応に供すると、試料中に検出すべき特定の塩基配列を有する核酸が存在すれば、該核酸はハイブリッド形成用水不溶性担体に結合している一本鎖部分を有する核酸とのハイブリッド形成をプローブと競合する。試料中に検出すべき核酸が存在しない場合には、プローブのみが担体上の一本鎖部分を有する核酸とハイブリッドを形成する。試料中に存在する検出すべき核酸の量に応じて担体上の一本鎖部分を有する核酸とハイブリッドを形成するプローブの量が減少するのでこのプローブを検出することにより、特定の塩基配列を含む核酸を特異

的に定量することができる。

サンドイッチ法と競合法では、核酸を結合した粒子に核酸を含む検体試料と標識核酸プローブとハイブリッド形成に適當な緩衝液とを添加し、適當な温度下に2時間程度放置することによってハイブリッドを形成させる。次いで遠心分離等によって過剰の標識核酸プローブを除去し、担体に結合された標識を分析によって検出する。

上記の本発明の核酸の検出方法は、バクテリア、ウィルス等の病原体の検出、抗生物質や抗ウィルス剤のスクリーニング、遺伝障害の診断およびガン細胞の検出に利用することができる。

さらに、本発明は、核酸の分離方法にも関する。

すなわち、本発明は、

核酸試料中から特定の塩基配列を含む核酸を分離する方法であって、

前記特定の塩基配列の少なくとも一部に対して相補的な塩基配列を含む核酸を、少なくとも該相補的な塩基配列の部分が一本鎖である状態で、有機高分子物質からなり表面が非多孔質の粒径0.01

～50 μ mの粒子の表面に結合してハイブリッド形成用水不溶性担体を形成し、

次に、該担体と、前記の核酸試料中の特定の塩基配列を含む核酸とをハイブリッド形成せしめ、

次に、前記担体とハイブリッド形成した核酸を分離することからなる核酸の分離方法を提供するものである。

この方法において、分離しようとする核酸を前記担体とのハイブリッドとして、担体上の核酸とハイブリッド形成しなかった核酸その他の夾雑物から分離するには、これらの不要な核酸等を遠心分離法等により除去した後、ハイブリッドを構成している核酸分子間の水素結合を切るような熱処理、あるいはアルカリ、ホルムアミド、尿素、もしくは硫酸グアニジンによる処理などを行って、目的とする特定塩基配列をもつ核酸を回収することにより核酸を精製することができる。

この核酸の分離方法は、例えば、細胞の粗抽出物等の試料から、ヒト、動物、植物あるいは微生物にとって有用なタンパク質の合成をコードする

メッセンジャーRNA、DNA等の特定塩基配列を有する核酸を分離し、あるいは精製するのに有用である。DNAのクローン化等の核酸の分離、精製は特にDNAのクローン化など遺伝子組換えの研究分野で重要な技術であり、簡便かつ信頼できる技術の開発が望まれているが、上記の方法はこの要請に応えるものである。

実施例

以下、実施例に基づき、本発明を具体的に説明する。但し、本発明は、実施例に限定されるものではない。

実施例1.

ヒトRotaウィルス遺伝子第10分節をクローン化して得たcDNAを組み込んだプラスミドpBR322(pBR322-RotaウィルスcDNA) [Imai et al: Proceeding of the National Academy of Sciences, Vol.80, 373頁(1983)] と³²Pで標識したヒトRotaウィルス遺伝子第10分節のクローン化DNA(ヒトRotaウィルスcDNA) からなる標識DNAプローブとのハイブリッド形成

(1) 一本鎖化したpBR322-Rota ウィルスcDNAを結合した担体の調製

粒径0.372 μm 、表面荷電0.134meq/gなるカルボキシ変性ラテックスイムテックス®G0303(日本合成ゴム製)の1(w/v) %懸濁液(pH3.5)100 μL と、水溶性カルボジイミドの2.5mg/mLの水溶液(pH3.5)100 μL と、95℃で5分間加熱後氷浴中で急冷して一本鎖化したpBR322-Rota ウィルスcDNAの150 $\mu\text{g/mL}$ の水溶液1 μL (pBR322-Rota ウィルスcDNAとして0.15 μg)とを遠心分離用試験管中で混合し、室温で5分間放置した後水1 mLを添加して10,000rpmで5分間遠心してラテックスの固形分を回収した。

次いで、ラテックス固形分に洗浄のために下記組成:

- 5mM トリス-塩酸緩衝液、
- 0.5(w/v) %、ドデシル硫酸ナトリウム、
- 75mM クエン酸ナトリウム、
- 750mM 塩化ナトリウム50(v/v) %ホルムアミドのハイブリッド形成用緩衝液 100 μL を添加し、

で、30分間の反応で16%の α - ^{32}P -CTPが、ヒトRotaウィルスcDNAに取り込まれ、 $2.5 \times 10^7\text{cpm}/\mu\text{g}$ のカウンタをもつヒトRotaウィルスcDNAからなる標識DNAプローブを得た。

(3) pBR322-Rota ウィルスcDNAと標識DNA プローブのハイブリッド形成

(1)で調製したpBR322-Rota ウィルスcDNAを結合した担体に、前記ハイブリッド形成用緩衝液 100 μL と(2)で調製した標識DNAプローブをカウンタ数が100,000cpm相当になる量添加し、攪拌後、37℃で1.5時間放置しハイブリッド形成反応を行なわせた。その後、水1 mLを添加して10,000rpmで5分間遠心し、担体を回収して担体上にハイブリッド形成によってトラップされた標識DNAプローブのカウンタ数を測定した。

この結果、ハイブリッド形成効率は77%と高いものであった。

ここで、ハイブリッド形成効率は、ハイブリッド形成に用いた標識DNAプローブのカウンタ数(100,000cpm)に対する担体上にトラップされた標

識DNAプローブのカウンタ数の割合を示すものである。また、ハイブリッド形成反応の時間を2~18時間に変えてもハイブリッド形成効率に変化は認められなかった。

なお、pBR322-Rota ウィルスcDNAを結合していないラテックス、すなわちイムテックス®G0303をpBR322-Rota ウィルスcDNAを結合した担体の代わりに用いた以外は上記と同様に操作しても、該ラテックス粒子上にトラップされた標識DNAプローブのカウンタ数は2,000cpmにすぎなかった。

比較例 1

実施例 1 (1)で用いた一本鎖化したpBR322-Rota ウィルスcDNAの150 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液1 μL を、常法どおりニトロセルロースメンブランフィルターにスポットし(スポットの面積は約0.8 cm^2)、80℃で3時間真空下で加熱後、プラスチックバッグに入れてアレハイブリダイゼーション(10(w/v) %の細断化した仔ウシ胸腺DNAを添加したハイブリッド形成用緩衝液中で37℃、1時間のインキュベーション)を行い、溶液を除去した。

(2) 標識 DNA プローブの調製

ヒトRotaウィルスcDNA 1 μg をニックトランスレーション法を用いて(α - ^{32}P)CTP(シチジン5'-三リン酸:50 μM キュリー、比放射活性3000キュリー/ μmole)で標識した。これにより、15

次いで、プラスチックバッグに実施例1(3)で用いたハイブリッド形成用緩衝液 100 μ l と標識 DNAプローブをカウント数が100,000cpm相当になる量添加し、37℃で18時間インキュベーションした後、バッグから取り出したフィルターを2倍濃度 SSC溶液中55℃で2時間洗浄した。フィルターに残った標識 DNAプローブのカウントを測定して実施例1(3)と同様にして求めたハイブリッド形成効率は6%にすぎなかった。

実施例2

ヒトRotaウィルスの第10遺伝子分節に対応するメッセンジャーRNA の分離および精製

(1) 一本鎖化したpBR322-Rota ウィルスcDNAを結合した担体の調製

粒径 0.372 μ m、表面荷電0.134meq/gであるカルボキシ変性ラテックス、イムテックス®G0303 (日本合成ゴム特製) の1 (w/v) %懸濁液(pH3.5) 200 μ l と、水溶性カルボジイミドの 2.5mg/ml の水溶液(pH3.5) 200 μ l と、95℃で5分間加熱後急冷して一本鎖化したpBR322-Rota ウィルスcDNA

る量の (α -³²P) UTP ウリジン5'-三リン酸、および 175unitのRNasin® (プロメガバイオテック社製造、RNA の分解酵素の阻害剤) とともに、37℃で4時間インキュベーションし、遠心分離の後上清を回収した。この上清をフェノールで抽出し、セファデックス®G-100(ファルマシア社製) のカラムに通して、素通り分画を回収した。この分画には、ヒトRotaウィルスの第1遺伝子分節から第11遺伝子分節に対応する11種類のメッセンジャーRNA が含まれている。

得られた回収液は、1 μ l 当たり30ngのメッセンジャーRNA を含み、50,000cpm のカウントをもっていた。

(3) ヒトRotaウィルスの第10遺伝子分節に対応するメッセンジャーRNA の分離

(1)で調製したpBR322-Rota ウィルスcDNAを結合した担体に、実施例1と同様のハイブリッド形成用緩衝液 200 μ l と、(2)で調製した標識したメッセンジャーRNA 20 μ l とを混合し、37℃でインキュベーションし、ハイブリッドを形成せしめた。

の 2 mg/ml の水溶液 5 μ l とを、遠心分離用試験管中で混合し、室温で5分間放置した後、水 1 ml を添加して10,000rpm で5分間遠心してラテックスの固形分を回収した。次いでラテックス固形分に洗浄のために実施例1と同様のハイブリッド形成用緩衝液 200 μ l を添加し、攪拌した後すぐに水 1 ml を添加して10,000rpm で5分間遠心してラテックスの固形分を回収して一本鎖のpBR322-RotaウィルスcDNAを結合した担体 2 mgを得た。

(2) 標識したヒトRotaウィルスのメッセンジャーRNA の調製

ヒトRotaウィルスを感染したアフリカミドリザル腎臓細胞からウィルスを精製し、このRotaウィルスをEDTA (エチレンジアミン四酢酸) で処理して得たコア(core)粒子を10mMのトリス塩酸緩衝液(pH8) 中で、10mMとなる量の塩化マグネシウム、2mMとなる量のアデノシン5'-三リン酸、2mMとなる量のシチジン5'-三リン酸、2mMとなる量のグアノシン5'-三リン酸、0.2mMとなる量のウリジン5'-三リン酸、50 μ l キューリーとな

インキュベーション開始後、0分、30分、60分、90分、120分および180分の時点で25 μ l ずつ抜きとり、2倍濃度 SSC溶液 300 μ l を添加して10,000rpm で5分間遠心した。

遠心分離した後、上清を回収し、メッセンジャーRNA をエタノール中で沈殿させた(このサンプルを、以下「サンプル(U)」と呼ぶ; Uはunbound(結合していないことを示す英語)に由来する)。

また、前記遠心分離で回収した担体に、90(v/v) %ホルムアミド、10mMトリス-塩酸緩衝液、1mM EDTAおよび0.1(w/v) %ドデシル硫酸ナトリウムからなる水溶液50 μ l を添加し、攪拌後室温で5分間放置してから2倍濃度 SSC溶液 250 μ l を添加した。これを10,000rpm で5分間遠心し、上清中に溶解したメッセンジャーRNA をエタノール中で沈殿させた(このサンプルを、以下、「サンプル(B)」と呼ぶ; Bはbound(結合していることを示す英語)に由来する)。

次いで、インキュベーション時間の異なる6種

のサンプル(U)と6種のサンプル(B)のそれぞれを5 μ lの積載用(ローディング)緩衝液(95(v/v)%ホルムアミド、10mM EDTA、0.1(w/v)%キシレンシアノールおよび0.1(w/v)%ブロモフェノールブルーを含有)に溶解し、90℃で2分加熱した後氷冷して7Mの尿素を含有する8(w/v)%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルの厚み0.3mmで1,000Vで20時間泳動した後、X線フィルムに感光させて泳動パターンの写真を得た。これらの写真を参考図として本明細書に添付する。参考図の右端に示す番号は、該当バンドの遺伝子分節番号である。

得られた泳動パターンの比較により、インキュベーション時間120分および180分のサンプル(U)からヒトRotaウイルス第10遺伝子分節に対応するメッセンジャーRNAのバンドがハイブリッド形成により消失していることを確認した。

また、インキュベーション時間が30分以上のサンプル(B)には、ヒトRotaウイルス第10遺伝子分節に対応するメッセンジャーRNAのバンドのみ

が観察され、ヒトRotaウイルス第10遺伝子分節に対応するメッセンジャーRNAが高純度で分離、精製されることを確認した。

また、最終的に担体上に残留したカウント(これをカウント(L)と呼ぶ)と、サンプル(B)のカウント(これをカウント(B)と呼ぶ)から、

$$\left(\frac{\text{カウント(B)}}{\text{カウント(L)} + \text{カウント(B)}} \right) \times 100$$

の計算式により回収率を求めたところ、回収率は、インキュベーション時間30分、60分、90分、120分および180分のすべてのサンプルについて85%以上という高い値を示した。

(発明の効果)

本発明の担体は核酸の特定の塩基配列を検出するに際して、ハイブリッド形成を短時間で簡便な操作で実施することを可能とし、しかもハイブリッド形成効率を飛躍的に高いものとすることができる。

また、ハイブリッド形成分析においては、検出の際の非特異吸着が少なく、感度や精度を向上さ

せることを可能とするものである。

本発明の担体は、上記効果を有するものであることから、検体中の微量の核酸の検出以外にも、試料中に大量に存在する核酸の分離、精製等に好適に用いることができる。

代理人 弁理士 岩見谷 周志